



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1981- 5980

Dezembro, 2009

versão

ON LINE

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 101

Metodologia Científica: Otimização do Processo de Extração de Compostos Fenólicos Antioxidantes de Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)

Márcia Vizzotto
Marina Couto Pereira

Pelotas, RS
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96001-970 - Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 - 3275-8221
Home page: www.cpact.embrapa.br
E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior

Secretária-Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia

Membros: José Carlos Leite Reis, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro Bertoldi e Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Suplentes: Márcia Vizzotto e Beatriz Marti Emygdio

Supervisor editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberle

Revisão de texto: Marcos de Oliveira Treptow

Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Editoração eletrônica e capa: Sérgio Ilmar Vergara dos Santos

Foto da capa: Maria do Carmo Bassols Raseira

1ª edição

1ª impressão (2009): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Vizzotto, Márcia.

Metodologia científica: otimização do processo de extração de compostos fenólicos antioxidantes de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) / Márcia Vizzotto, Marina Couto Pereira. — Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

19p.— (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 101).

ISSN 1678-2518

Mirtilo – Alimento funcional – Fitoquímico – DPPH – Folin-Ciocalteu. I. Pereira, Marina Couto. II.Título. III.Série.

CDD 634.737

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	7
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	10
Resultados e Discussão.....	11
Conclusões.....	17
Referências.....	17

Metodologia Científica: Otimização do Processo de Extração de Compostos Fenólicos Antioxidantes de Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)

Márcia Vizzotto¹

Marina Couto Pereira²

Resumo

É conhecida a correlação entre o consumo de frutas e hortaliças e a manutenção da saúde; porém, existem muitas frutas que precisam ser estudadas considerando as condições ambientais onde são produzidas. Além disso, os métodos utilizados para extrair os compostos bioativos precisam ser adaptados às especificidades de cada tecido. As condições ótimas para a extração de compostos fenólicos antioxidantes de mirtilo foram determinadas utilizando o método convencional líquido-sólido. Para otimização do processo foram utilizados frutos da cultivar Bluegen. Os compostos fenólicos totais foram determinados por espectrofotometria no comprimento de onda de 725nm, utilizando o reagente folin-ciocalteau, e a atividade antioxidante foi determinada a 515nm, utilizando o radical estável DPPH. Os fatores considerados para otimização do processo de extração foram os seguintes: volume e tipo de solvente, tempo de extração, misturas de solventes, acidez e pH. De acordo com os resultados, o teor de compostos fenólicos totais não alterou-se com o volume crescente de metanol, porém houve um aumento da atividade antioxidante. O período de maceração não interferiu na extração dos compostos bioativos. O solvente mais eficiente para extrair compostos fenólicos antioxidantes de mirtilos é a acetona. Misturas de solventes não

¹Engenheira Agrônoma, PhD. em Horticultura, Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, vizzotto@cpact.embrapa.br

²Nutricionista, Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, marinacoutopereira@hotmail.com

mostraram diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos totais, no entanto, a atividade antioxidante foi maior com a mistura de metanol, etanol e acetona. A acetona é o solvente mais eficiente para extrair compostos fenólicos antioxidantes de mirtilo, entretanto metanol acidificado pode ser uma opção.

Termos para indexação: alimentos funcionais, DPPH, Folin-Ciocalteu

Scientific Methodology: Optimization of the Extraction Process of Antioxidant Phenolic Compounds from Blueberry (*Vaccinium ashei* Reade)

Márcia Vizzotto¹

Marina Couto Pereira²

Abstract

It is well known the correlation of fruits and vegetables consumption and health; however, there are many fruits that need to be studied considering the environmental growing conditions. Besides, methods to extract the bioactive compounds need to be adapted to the specific tissues. Optimal conditions for blueberry antioxidant phenolics extraction were determined using the conventional liquid-solid method. For the optimization process fruits from Bluegen blueberry cultivar were used. Total phenolic content was measured by spectrophotometer at 725nm using the folin-ciocalteau reagent mix. The antioxidant activity was measured at 515nm using the stable radical DPPH. The following parameters were considered: solvent volume and types, extraction time, solvent mixture, and acidity/ph. According to the results, total phenolic content did not change with the methanol volume; however, the antioxidant activity increased as the volume increased. The maceration time did not interfere on the extraction of bioactive compounds. Acetone is the best solvent to extract blueberry antioxidant compounds. Mixtures of solvents showed no difference in total phenolic content; however, the antioxidant activity was higher with the mixture of methanol, ethanol and acetone. Acetone was the most efficient solvent to extract blueberry phenolic compounds; however, acidified methanol may also be an option.

Index terms: functional food, DPPH, folin-ciocalteau

Introdução

As frutas vermelhas e/ou pequenas frutas, como o mirtilo, têm diferentes grupos de fitoquímicos que podem trazer benefícios para a saúde, quando consumidas como parte da dieta habitual. Estudos epidemiológicos mostram evidências de que o consumo dessas frutas está associado à prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis (HERTOG et al., 1995), principalmente devido à presença de compostos bioativos tais como ácidos fenólicos e flavonóides (FELDMAN, 2001; SHAHIDI e NACZK, 2004). Além disso, existe uma boa correlação entre as concentrações de compostos fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante em mirtilos (PRIOR et al., 1998; HAKKINEN et al., 1999; TARUSCIO et al., 2004).

Existem vários fatores que podem afetar o conteúdo de compostos fenólicos em mirtilos, tais como a maturidade dos frutos, diferenças genéticas (cultivares), condições ambientais e de processamento (KALT et al., 1999; DEIGHTON et al., 2000; HAKKINEN e TÖRRÖNEN, 2000; WANG e LIN, 2000; CONNOR et al., 2002; SIRIWOHARN et al., 2004). No Brasil, as cultivares normalmente exploradas são do grupo rabbiteye, que estão melhor adaptadas às condições climáticas, uma vez que são mais rústicas, porém as frutas são de qualidade inferior comparativamente às cultivares do grupo highbush, que são cultivadas principalmente nos Estados Unidos.

As metodologias utilizadas para determinação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante são baseadas em artigos mundialmente conhecidos (SWAIN e HILLIS, 1959; BRAND-WILLIAMS et al., 1995). No entanto, sabe-se que cada tecido possui uma matriz complexa e única, e o mesmo processo de extração destes compostos pode não ser eficiente para todas as espécies.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar uma metodologia de extração de compostos fenólicos antioxidantes encontrados em mirtilo.

Material e Métodos

Preparo de Amostras: mirtilos da cultivar Bluegen foram colhidos no estágio maduro e armazenados em freezer a -18° C até o momento das análises (em torno de um mês de armazenamento), quando foram homogenizados visualmente por tamanho e cor. Para cada ensaio foram utilizadas 100 frutas. Destas frutas foi retirada, para as análises, uma amostra de 5g composta apenas pelas suas porções equatoriais (as frutas foram cortadas manualmente utilizando faca de cozinha) e em triplicata. As amostras foram submetidas a vários testes (descritos abaixo), visando a máxima extração dos compostos fenólicos. Para todos os testes as amostras foram preparadas em triplicatas, trituradas em um moedor do tipo turrax, dimensionado para amostras pequenas e centrifugadas em centrífuga refrigerada com temperatura em torno de 4°C a 15.000rpm. Após, foram realizadas as análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante conforme métodos descritos abaixo.

Relação amostra:solvente: para realização deste teste, manteve-se fixo o peso de amostra (5g de mirtilo) e variou-se o volume do solvente (10mL, 20mL, 30mL, 40mL e 50mL de Metanol). Foi realizada uma única extração.

Período de maceração: para este teste foram utilizados 20mL de metanol como solvente padrão. Após serem trituradas, as amostras foram submetidas a diferentes períodos de maceração, procedimento anterior à centrifugação. Os períodos de maceração testados foram: 0, 2, 4, 6 e 24 horas. As amostras foram mantidas no escuro (sob papel alumínio) durante todo o período de maceração.

Tipos de solventes: para cada 5g de mirtilo foram utilizados 20mL dos seguintes solventes (todos os solventes foram testados puros): água ultra pura, metanol, etanol, acetona e hexano.

Misturas de solventes: utilizou-se 5g de mirtilo com a mistura dos seguintes solventes: 70% metanol:30% água ultra pura; 70% etanol:30% água ultra pura; 50% metanol:50% etanol; 45% metanol:45% etanol:10% água ultra pura; 45% metanol:45 etanol:10% acetona

Solventes acidificados: os solventes utilizados para este teste foram a água ultra pura, metanol e etanol. As concentrações de HCl para acidificar os solventes foram 0,15%, 0,10%, 0,01% e 0,005%.

Quantificação dos fenólicos totais: uma alíquota de 250 μ L do sobrenadante da amostra de mirtilo (que foi previamente centrifugado em cada teste acima descrito) foi diluída em 4mL de água ultrafiltrada. Ao mesmo tempo, um controle foi preparado contendo 250 μ L de metanol. Cada amostra e o controle foram combinados com 250 μ L do reagente folin-ciocalteau (SWAIN e HILLIS, 1959) 0,25N que reagiram por 3 minutos antes de adicionar 500 μ L de Na₂CO₃ 1N. As misturas foram incubadas por 2h à temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 725 nm. O espectrofotômetro foi zerado usando o controle e as medidas feitas em cubeta de quartzo. Toda vez que a absorbância foi superior a 0,6 unidades de absorbância (UA), as amostras foram diluídas e reanalisadas. Uma curva padrão para o ácido clorogênico foi construída.

Atividade antioxidante: uma alíquota de 200 μ L do sobrenadante da amostra de mirtilo (que foi previamente centrifugado em cada teste acima descrito) foi combinada com 3800 μ L da solução do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) diluído (de uma solução concentrada) em metanol até uma absorbância de $1,1 \pm 0,02$ UA a 515 nm. Um controle foi preparado simultaneamente com 200 μ L de metanol. As amostras e o controle reagiram por 24h (ou até a reação estar estabilizada). O espectrofotômetro foi zerado com metanol. A absorbância foi medida com uma cubeta de quartzo a 515 nm. Quando a absorbância foi menor que 0,2UA, as amostras foram diluídas em metanol e reanalisadas. Uma curva padrão foi construída para o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro através do programa estatístico SPSS for windows.

Resultados e Discussão

Os teores de compostos fenólicos totais não sofreram alterações com o volume de solvente utilizado, no entanto, a atividade antioxidante é tanto maior quanto maior o volume de solvente (Tabela 1). Este resultado mostra que o solvente pode ser economizado evitando os elevados volumes de resíduos no processo de extração de compostos fenólicos totais. O aumento na atividade antioxidante, provavelmente, deve-se a extração de outros compostos, que não fenólicos. O primeiro passo para otimizar a

metodologia de extração foi determinar a relação ideal entre o volume de solvente utilizado e a massa da amostra. Para este teste preliminar utilizou-se o metanol, que é o solvente amplamente utilizado para extração de fitoquímicos.

Geração de resíduos em laboratório é um grave problema ambiental e deve ser reduzida ao mínimo, sem perder a eficiência de extração. Normalmente, a relação considerada eficiente para extração de compostos fenólicos é de 3:1, ou seja, 3 partes de solvente para 1 parte de amostra fresca, mas, em alguns casos esta relação pode ser ainda menor. Em outros estudos, foi comparada a extração de compostos fenólicos em uma única etapa e em múltiplas etapas, observou-se que não houve diferenças significativas entre as duas formas de extração (CHIRINOS et al., 2006), sendo que em etapa única há redução de tempo e mão-de-obra. Portanto, o volume selecionado para as análises seguintes foi de 20mL, o qual permitiu a máxima extração dos compostos antioxidantes com o mínimo uso de solvente.

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em mirtilos cultivar Bluegen, utilizando diferentes volumes do solvente metanol para extração. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2009.

Volume metanol(mL)	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²
10	944,0 ± 5,9 ^{ns}	7189,1 ± 173,2 c
20	957,7 ± 29,8	7885,4 ± 343,1 bc
30	874,1 ± 45,9	9235,6 ± 185,9 b
40	885,9 ± 12,8	9743,0 ± 721,6 ab
50	906,1 ± 52,2	11193,2 ± 355,1 a

Médias de três repetições ± erro padrão. ¹ Compostos fenólicos totais expressos em mg equivalente do ácido clorogênico/100g de peso fresco. ² Atividade antioxidante expressa em µg equivalente trolox/g de peso fresco. ^{ns} não significativo (p= 0,05).

O período de maceração não interferiu na extração de compostos fenólicos e nem sobre a atividade antioxidante (Tabela 2). Esse resultado é interessante porque evidencia que mais amostras podem ser analisadas em menor período, pois não existe qualquer necessidade de realizar maceração, o que torna o método mais fácil, rápido e barato.

Tabela 2. Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em mirtilos cultivar Bluegen, utilizando variados períodos de maceração.

Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2009.

Período de maceração(hs)	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²
0	847,4± 34,2 ^{ns}	7274,2± 188,0 ^{ns}
2	855,6± 28,3	8147,5± 427,8
4	929,7± 22,5	7813,4± 352,1
6	883,0± 12,7	7342,4± 66,0
24	896,6± 30,7	7695,5± 357,5

Médias de três repetições ± erro padrão. ¹ Compostos fenólicos totais expressos em mg equivalente do ácido clorogênico/100g de peso fresco. ²

Atividade antioxidante expressa em µg equivalente trolox/g de peso fresco. ^{ns} não significativo (p= 0,05).

Entre os solventes testados, o uso da acetona proporcionou os melhores resultados seguidos do metanol e do etanol (Tabela 3). Provavelmente isso possa ser atribuído à polaridade dos solventes testados. A acetona extrai compostos fenólicos de polaridade intermediária, enquanto que o etanol e o metanol extraem compostos mais polares. A eficiência dos solventes estudados para extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante apresentou a seguinte ordem: acetona > etanol = metanol > água. Estes resultados estão de acordo com outros autores, os quais sugerem que solventes com alta polaridade, como a água, e solventes com polaridade muito baixa, ou apolares, não são bons extratores (LIU et al., 2000, CHIRINOS et al., 2006). Desta forma, os compostos fenólicos do mirtilo parecem apresentar características moderadamente polares. O metanol é bastante utilizado para extração de compostos fenólicos com eficiência (TSAO e DENG, 2004; SHI et al., 2005). A água como solvente extrator não foi muito eficiente. Esta, considerada o solvente universal, em combinação com outros solventes orgânicos, contribui para criar um meio moderadamente polar, o que favorece a extração de polifenóis (LAPORNIK et al., 2005; LIYANA-PATHIRANA e SHAHIDI, 2005). No entanto, o uso de água pura resulta em extratos com alta impureza por extrair também compostos como ácidos orgânicos, açúcares, proteínas solúveis podendo interferir na quantificação dos compostos fenólicos (CHIRINOS et al., 2006).

Tabela 3. Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em mirtilos cultivar Bluegen, utilizando diferentes solventes e períodos de maceração. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2009.

Solventes	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²
Sem maceração ^{ns}		Com 24h de maceração ^{ns}		
Água	277,9±32,0 c	2494,7±248,5 c	171,2±10,8 c	2203,4±432,3 c
Metanol	751,8±41,5 b	8181,8±1072,8 b	749,5±20,4 b	7085,4±322,0 b
Etanol	723,6±07,1 b	8191,0±683,3 b	802,8±06,9 b	6871,6±577,9 b
Acetona	1214,5±32,9 a	15391,9±350,7 a	1309,4±40,6 a	15348,6±350,8 a

Médias de três repetições ± erro padrão. ¹ Compostos fenólicos totais expressos em mg equivalente do ácido clorogênico/100g de peso fresco. ² Atividade antioxidante expressa em µg equivalente trolox/g de peso fresco. ^{ns} não significativo (p=0,05).

Misturas de solventes não mostraram diferenças no teor de compostos fenólicos totais; no entanto, a atividade antioxidante foi maior com a mistura de metanol, etanol e acetona (Tabela 4). Acetona é menos polar e, provavelmente, em mistura com etanol e metanol, consegue extrair alguns compostos que não são normalmente extraídos com estes solventes utilizados puros.

Tabela 4. Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em mirtilos cultivar Bluegen, utilizando diferentes misturas de solventes. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2009.

Mistura de solventes	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²
Metanol:água 70:30	693,9±37,0 ^{ns}	7103,2±201,0 b
Etanol:água 70:30	746,5±30,1	8508,9±269,6 ab
Metanol:etanol 50:50	653,0±22,6	7062,1±384,1 b
Metanol:etanol:água 45:45:10	746,6±20,4	8198,4±222,5 ab
Metanol:etanol:acetona 45:45:10	808,6±57,8	9261,8±562,7 a

Médias de três repetições ± erro padrão. ¹ Compostos fenólicos totais expressos em mg equivalente do ácido clorogênico/100g de peso fresco. ² Atividade antioxidante expressa em µg equivalente trolox/g de peso fresco. ^{ns} não significativo (p=0,05).

O metanol foi o mais eficiente solvente para extração de compostos fenólicos, quando comparado ao etanol ou à água, sendo este resultado mais evidente quando acidificado com HCl (Tabela 5). A acidificação dos solventes geralmente aumenta o seu poder para extrair compostos fenólicos. No entanto, os resultados não se comparam aos da utilização da acetona pura que apresentou valores muito superiores.

Neste trabalho, buscou-se igualar os resultados da utilização de solventes como metanol e etanol à acetona, devido à dificuldade no processo de compra deste reagente por ser controlado. No entanto, a utilização da acetona pura se mostrou o melhor solvente para extração de compostos fenólicos antioxidantes em mirtilos. Uma alternativa viável é, assim, a acidificação do metanol a 0,01% com HCl.

Tabela 5. Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em mirtilos cultivar Bluegen, utilizando diferentes solventes e níveis de acidificação. Empresa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2009.

Acidez (%)	Água C			Metanol A			Etanol B		
	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²	Compostos fenólicos totais ¹
0,15	446,2 ± 50,3 ab	3273,5 ± 233,4 ^{ns}	964,9 ± 20,3 a	8989,3 ± 117,5a	817,8 ± 28,3 ab	8256,2 ± 237,5 ^{ns}			
0,10	384,6 ± 14,6 ab	3819,3 ± 556,5	872,1 ± 24,4 ab	8872,4 ± 211,8 a	720,4 ± 36,4 b	7120,0 ± 112,8			
0,01	341,2 ± 44,2 ab	3762,9 ± 491,8	871,7 ± 21,7 ab	9066,4 ± 106,8 a	840,4 ± 11,6 a	7990,5 ± 194,4			
0,005	489,6 ± 29,2 a	4077,5 ± 181,3	842,3 ± 35,1 ab	8324,6 ± 320,2 b	752,3 ± 24,7 ab	7736,2 ± 193,4			
0,000	277,9 ± 32,0 b	2494,7 ± 143,5	751,8 ± 20,2 b	7527,1 ± 451,1 b	723,6 ± 7,1 b	8191,0 ± 394,4			

Medias de três repetições ± erro padrão. ¹ Compostos fenólicos totais expressos em mg equivalente do ácido clorogênico/100g de peso fresco. ² Atividade antioxidante expressa em µg equivalente trolox/g de peso fresco. ^{ns} não significativo (p = 0,05).

Acidez (%)	Água C			Metanol A			Etanol B		
	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²	Compostos fenólicos totais ¹	Atividade antioxidante ²	Compostos fenólicos totais ¹
0,15	446,2 ± 50,3 ab	3273,5 ± 233,4 ^{ns}	964,9 ± 20,3 a	8989,3 ± 117,5a	817,8 ± 28,3 ab	8256,2 ± 237,5 ^{ns}			
0,10	384,6 ± 14,6 ab	3819,3 ± 556,5	872,1 ± 24,4 ab	8872,4 ± 211,8 a	720,4 ± 36,4 b	7120,0 ± 112,8			
0,01	341,2 ± 44,2 ab	3762,9 ± 491,8	871,7 ± 21,7 ab	9066,4 ± 106,8 a	840,4 ± 11,6 a	7990,5 ± 194,4			
0,005	489,6 ± 29,2 a	4077,5 ± 181,3	842,3 ± 35,1 ab	8324,6 ± 320,2 b	752,3 ± 24,7 ab	7736,2 ± 193,4			
0,000	277,9 ± 32,0 b	2494,7 ± 143,5	751,8 ± 20,2 b	7527,1 ± 451,1 b	723,6 ± 7,1 b	8191,0 ± 394,4			

Conclusões

O volume do solvente interfere na atividade antioxidante, mas não no teor de compostos fenólicos totais;

O tempo de maceração não interfere no teor de compostos fenólicos totais e nem na atividade antioxidante, sendo uma etapa desnecessária na extração de amostras de mirtilo;

As misturas de solventes, nas proporções testadas, não interferem no teor de compostos fenólicos totais;

A acetona é o melhor solvente para extrair compostos fenólicos antioxidantes do mirtilo. Entretanto, por ser a acetona um solvente com venda controlada, o metanol acidificado também pode ser utilizado para extração em mirtilo, por ser eficiente extrator de compostos fenólicos antioxidantes.

Referências

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavon) Tubers. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 55, p. 217-225, 2006.

CONNOR, A. M.; LUBY, J. J.; TONG, C. B. S.; FINN, C. E.; HANCOCK, J.F. Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. **Journal for American Society for the Horticultural Science**, Washington, v. 127, p. 89-97, 2002.

DEIGHTON, N.; BRENNAN, R.; FINN, C.; DAVIES, H. V. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. **Journal of Science and Food Agriculture**, Washington, v. 80, p. 1307-1313, 2000.

FELDMAN, E. B. Fruits and vegetables and the risk of stroke. **Nutritional Review**, Cambridge, v. 59, p. 24-27, 2001.

HAKKINEN, S.; HEINONEN, M.; KARENLAMPI, S.; MYKKANEN, H.; RUUSKANEN, J.; TORRONEN, R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. **Food Research International**, Washington, v. 32, p. 345-353, 1999.

HAKKINEN, S. H.; TORRONEN, A. R. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. **Food Research International**, Washington, v. 33, p. 517-524, 2000.

HERTOG, M. G. L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; CIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B. S.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archive of Internal Medicine**, California, v. 155, p. 381-386, 1995.

KALT, M.; FORNEY, C. F.; MARTIN, A.; PRIOR, R. L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 4638-4644, 1999.

LAPORNIK, B.; PROŠEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extract prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, London, v. 71, p. 214-501, 2005.

LIU, F.F.; ANG, C.Y.W.; SPRINGER, D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* Using Surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Washington, v. 48, p. 3364-3371, 2000.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolics compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, Washington, v. 93, p. 45-56, 2005.

PRIOR, R. L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; MCEWAN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 2686-2693, 1998.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 131-155.

SHI, J.; NAWAZ, H.; POHORLY, J.; MITTAL, G.; KAKUDA, I.; JIANG, Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods - engineering and technology. **Food Reviews International**, New York, v. 21, p. 139-166, 2005.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E.; FINN, C. E.; PEREIRA, C. B. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 8021-8030, 2004.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of Science and Food Agriculture**. Washington , v. 10, p. 63-68, 1959.

TARUSCIO, T. G.; BARNEY, D. L.; EXON, J. Content and profile of flavanoid and phenolic acid. Compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 3169-3176, 2004.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 812, p. 85-99, 2004.

WANG, S. Y.; LIN, H. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 140-146, 2000.